云 南 植 物 研 究 1991; 13(2): 189—195 ISSN 0253-2700
Acta Botanica Yunnanica CN 53-1039

红花愈伤组织诱导、生长及其α-生育酚的产生

甘烦远 郑光植

（中国科学院昆明植物研究所，昆明650204）

摘要 通过TLC和HPLC初步分析和鉴定，证明从红花（*Carthamus tinctorius*）无菌苗的胚根、胚轴及子叶和花蕾中诱导出的愈伤组织均具有合成α-生育酚的能力。其中以胚轴的愈伤组织和悬浮培养细胞的生长速率及α-生育酚的含量较高，分别达到0.35、0.39克干重/升·天和0.62、2.28毫克/100克干重样品。对红花细胞生长较适宜的培养基为MC培养基。培养基中附加10%椰子汁或0.1%酪蛋白氨基酸可使细胞生长显著提高，分别达到0.45和0.41克干重/升·天。

关键词 红花；α-生育酚；愈伤组织；生长速率；有机附加物

THE INDUCEMENT, GROWTH OF CALLUS AND ITS PRODUCTION OF α-TOCOPHEROL FROM CARTHAMUS TINCTORIUS

GAN Fan-Yuan, ZHENG Guang-Zhi

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica,* Kunming 650204)

Abstract Preliminary identification by TLC and HPLC methods demonstrated that the calli induced from root, hypocotyl, cotyledon and flower bud of *Carthamus tinctorius* had the capability to synthesize α-tocopherol which has the strongest activity among Vitamin E family. Among these calli, the hypocotyl-callus and its suspension cells were better than others in growth rate and α-tocopherol content. They reached 0.35, 0.39 gDW/l.d and 0.62, 2.28mg/100gDW respectively. MC medium was rather suitable for the cell growth of the callus which induced from hypocotyl. However, the medium supplemented with 10% CM(Coconut milk) or 0.1% CA(Casamino acid) could obviously raise cell growth rate, reached 0.45 or 0.41gDW/l.d

Key words *Carthamus tinctorius*; α-tocopherol; Callus inducement; Growth rate; Organic additives

---

1990年2月收稿，1990年5月定稿。

利用植物组织培养技术生产有用的天然化合物（包括药物、色素、香料和食品添加剂等）目前已在少数几种植物上获得商业性成功[1，2]。通过对培养条件的调控及筛选具有高产稳产性能的细胞变异系等是目前使培养细胞的生长和次级代谢产物含量显著提高的主要途径[3，4]。

红花（*Carthamus tinctorius*）是菊科一年生草本植物，其花及种子含微量生育酚类化合物。生育酚类化合物主要包括α-、β-、γ-和δ-生育酚等4种，其中以α-生育酚的生理活性最强，具有强的抗氧化性能并有防止衰老和防老年病的作用，因而在医药、食品和化妆品工业方面的需求量日益增大[5，6]。

生育酚在植物中以右旋体形式存在，其活性比消旋体形式的高1.36倍。目前化学合成的生育酚均为消旋体且α-生育酚所占比例不大。因而，从植物中提取具有高活性的生育酚的要求迅速增加。但由于生育酚在植物中含量极低[7]，所以通过植物组织培养的方法可能是大量生产具有高活性的生育酚的一条途径。

日本的Furuya等[7]曾从红花的花蕾的愈伤组织中分离到了生育酚。作者在此研究基础上，对红花的不同器官部位进行了愈伤组织诱导、培养及其产生α-生育酚能力的初步试验。

材料和方法

1.愈伤组织的诱导

红花种子经消毒后诱发出无菌苗。从无菌苗中分别剪取不同器官部位（胚根、胚轴及子叶）于常规条件下诱导愈伤组织。诱导培养基为附加2 ppm 2，4-D、0.1 ppmKT及10%CM（椰子汁）的MS琼脂培养基。于25±1°C暗中培养。切段（0.5—1 cm长）一周左右开始膨大，两周即长出愈伤组织。不同外植体的愈伤组织诱导率均达95%以上。

另外，剪取红花花蕾，用0.2%升汞消毒后用无菌水冲洗干净，去掉萼片，切取花小段（0.5—1 cm长）于相同的培养基和培养条件下两周左右亦可长出愈伤组织。

2.愈伤组织培养及细胞悬浮培养

不同器官来源的愈伤组织培养于含2 ppm 2，4-D、0.1 ppmKT和0.1%CA（酪蛋白氨基酸）的MS固体培养基上，每30天继代一次，每50 ml三角瓶装25 ml培养基。

细胞悬浮培养的培养基为附加1 ppm 2，4-D、0.1 ppmKT和0.1%CA的MS液体培养基，摇床转速为120 rpm，其他培养条件同上。悬浮细胞每3周继代一次。每250 ml的三角瓶中装65 ml的培养液。

3.细胞的生长速率测定

收获的愈伤组织或细胞悬浮培养物冰冻干燥或于50°C下干燥至恒重，称重后按下列公式计算细胞生长速率（单位：克干重/升·天）：

$$细胞生长速率\ (gDW/l.d) = \frac{(最终收获干重-接种干重)}{(培养天数\times 培养基体积)}$$

另外，测定了每个三角瓶收获的培养物干重数（gDW/flask），以示细胞得率。各

处理至少重复 3 次，结果为重复的平均值。

4. α-生育酚的提取及测定

干燥后的样品粉碎，过60目筛后称重，在40°C下用石油醚（mp30～60°C）暗中回流 8 小时，收集提取液后减压蒸干，再用石油醚定容至刻度。

α-生育酚的定性鉴定用TLC和HPLC方法进行。TLC法：硅胶G板（青岛），展开剂：苯：石油醚：醋酸乙酯 =3.5：6.3：0.2，显色剂：等体积的α、α-联吡啶三氯化铁溶液，其中α-生育酚遇显色剂变红色[8]。

α-生育酚的定量用 HPLC进行。柱：Zorbax ODS柱（4.6×250mm），流动相：甲醇，流速：1.5ml/min，柱温：50°C，检测波长：290nm，以标准的α-生育酚作对照，双点外标法定量计算。最后换算成每100g干重样品中含α-生育酚的毫克数(mg/100 gDW)，同时进行产率计算（mg/1）。α-生育酚的保留时间为4.06分钟（图 1）。

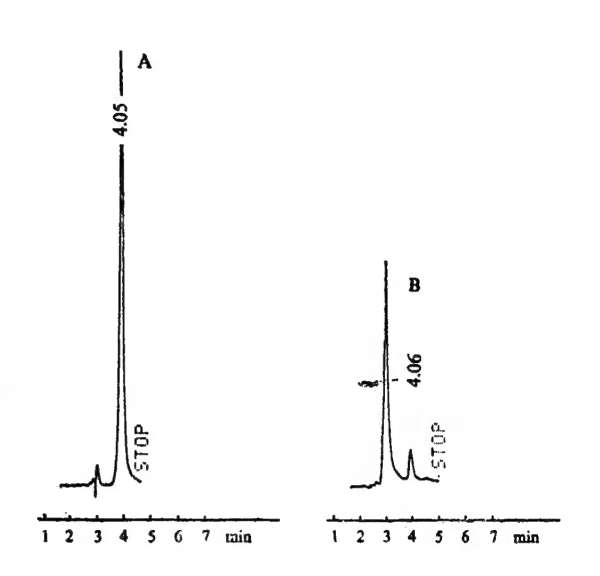


图 1　培养物中α-生育酚的高效液相色谱分离
A.标准的α-生育酚；　B.培养物的石油醚提取液
Fig. 1　Separation of α-tocopherol by HPLC
A.Standard α-tocopherol; B.The perroleum benzine extracts of cultures

结果与讨论

1.愈伤组织的初步选择

从红花的不同器官部位均能诱导出愈伤组织。愈伤组织在每次继代培养时，均选择生长较好、较疏松的新鲜的愈伤组织作为下一代继代的材料，连续继代五代后，各愈伤组织基本上均匀一致，质地较疏松并呈淡黄色。此时的愈伤组织已摆脱了母体的影响，成为一个新的独立系统[9]。从图 2 可以初步看出，从胚轴诱导出的愈伤组织比从其它部位诱导的生长快。

2.不同愈伤组织的培养比较

实验结果表明（表 1）：从不同器官诱导得到的愈伤组织均具有合成α-生育酚的能力。其中胚轴的愈伤组织在生长速率和在产物含量上均优于其他部位的愈伤组织，分别达到0.350gDW/l.d和0.62mg/100gDW，其次是花蕾和子叶的愈伤组织，胚根的愈伤组织最差。生育酚类化合物在叶绿体内、外均可以合成，但在红花中一般贮藏于种子和花的红花油中。因此，从次级代谢产物含量高的外植体诱导到的愈伤组织其代谢物产量不一定高，但不同来源的愈伤组织都具有合成其母体植株所存的次级代谢物的能力，证明了植物培养细胞产物全能性观点[10]。

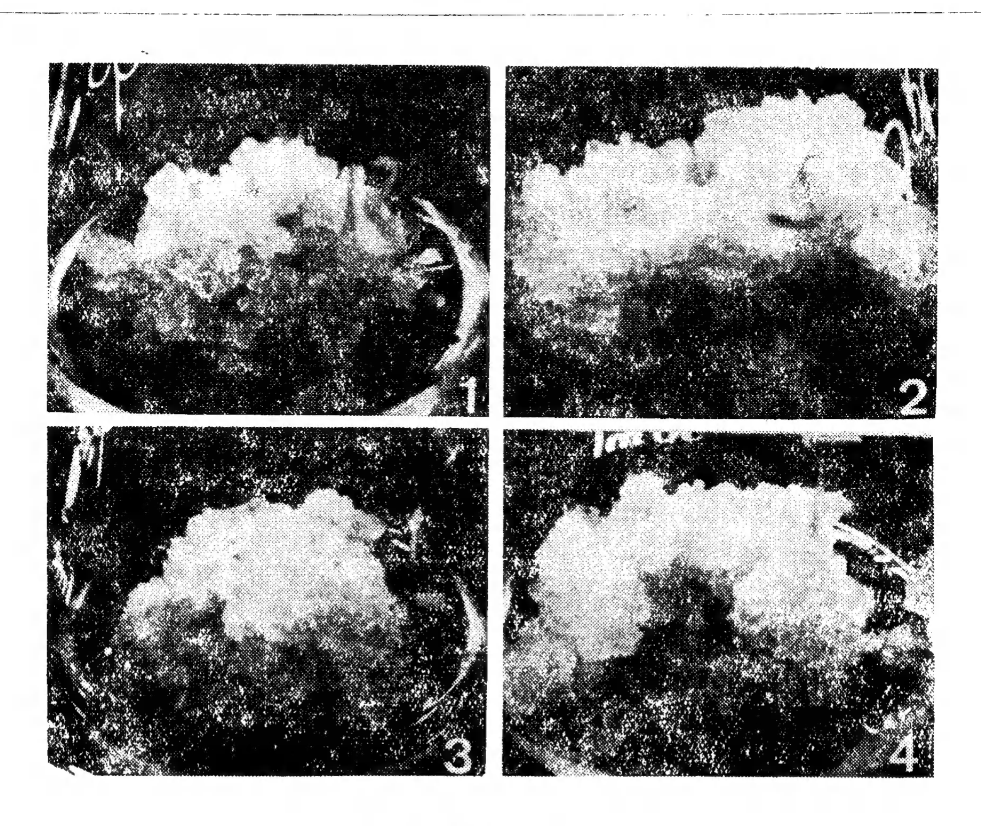


图 2 红花不同部位的愈伤组织培养
1.胚根愈伤组织； 2.胚轴愈伤组织； 3.子叶愈伤组织； 4.花蕾愈伤组织
Fig. 2 The culture of different calli from *Carthamus tinctorius*
1.Root-callus; 2.Hypocotyl-callus; 3.Cotyledon-callus; 4.Flower bud-callus

表 1 从红花不同器官上诱导的愈伤组织的比较
Table 1 The comparison among calli induced from different organs of *Carthamus tinctorius*

愈伤组织 Calli	收获干重（克/瓶） HarvestD.W (g/flask)	生长速率（克干重/升·天） Growth rate (gDW/l.d)	α-生育酚含量（毫克/100克干重） α-tocopherol content (mg/100gDW)	α-生育酚产率（毫克/升） α-tocopherol yield (mg/1)
胚根 Root	0.209	0.223	0.45	0.038
胚轴 Hypocotyl	0.285	0.350	0.62	0.073
子叶 Cotyledon	0.309	0.287	0.49	0.061
花蕾 Flower bud	0.296	0.296	0.57	0.067

3.不同来源的细胞悬浮培养的比较

不同来源的细胞悬浮培养的比较研究亦发现(表2)：由胚轴诱导的愈伤组织的细胞悬

浮培养亦均优于其它部位来源的细胞，生长速率和α-生育酚含量分别达到0.389 gDW/l·d和2.28mg/100gDW。并且各部位的细胞都具有合成α-生育酚的能力。另外，从表1和表2还可以看出，同一外植体来源的培养细胞在不同的培养系统中，除胚根细胞外，其他的外植体来源的培养细胞其悬浮培养在生长及α-生育酚产量上都比愈伤组织培养更优越。

对细胞的愈伤组织和悬浮培养的培养基也同时进行了α-生育酚的含量分析。结果发现细胞中合成的α-生育酚似乎全部积累于细胞中而不分泌到胞外。

通过以上的比较研究，建立了红花的组织培养，确立了以胚轴而来的愈伤组织作为进一步试验的原始材料。

表 2　红花不同部位细胞悬浮培养的比较

Table 2　the comparison between the different parts of suspension culture of *Carthamus tinctoriu*

悬浮培养 Suspension	收获干重（克/瓶） HarvestDW (g/flask)	生长速率（克干重/升·天） Growth rate (gDW/l·d)	α-生育酚含量（毫克/100克干重） α-tocopherol cont. (mg/100gDW)	α-生育酚产率（毫克/升） α-tocopherol yield (mg/l)
胚根细胞 Root-cell	0.397	0.151	0.57	0.035
胚轴细胞 Hypocotyl-cell	0.725	0.389	2.28	0.254
子叶细胞 Cotyledon-cell	0.680	0.312	2.04	0.214
花蕾细胞 Flower bud-cell	0.713	0.376	1.29	0.142

4.不同培养基的选择

在供试的6种培养基中（表3），MC培养基（见周平等报道[11]，但以0.1%CA代替CM和LH）对愈伤组织的生长最有效，生长速率达0.408gDW/l.d，MS、LS和6,7-V三种培养基对细胞生长的影响差别不大，而在White培养基中细胞生长最慢。由此可见，红花细胞较适合于在高盐培养基中生长。对α-生育酚的形成来说，MS和B_5培养基效果较好，但差别不明显。考虑细胞生长和产物积累两方面因素，应采用MC或B_5培养基。

5.不同有机附加物的效果

实验结果表明：培养基中添加10%CM或0.1%CA可使细胞生长速率达到0.449和0.408 gDW/l·d，分别比对照提高了53%和40%左右。但添加酵母提取液（1 g/l）能提高α-生育酚含量之外，其他有机附加物对α-生育酚的含量没有明显提高作用（表4）。考虑细胞的生长与产物积累两方面因素（即α-生育酚产率），在培养基中添加0.1%CA或1 g/l的酵母提取液是可取的。

本实验证明：改变培养条件会影响红花愈伤组织的生长和α-生育酚的积累。目前由于红花愈伤组织的生长较快，在以后的研究中，应该以提高α-生育酚的含量为首要目标。

表 3 不同培养基对红花愈伤组织生长和α-生育酚含量的影响

Table 3 The influence of media on callus growth and α-tocopherol content of *Carthamus tinctorius*

培养基 Media	收获干重(克/瓶) Harvest DW (g/flask)	生长速率(克干重/升·天) Growth rate (gDW/l·d)	α-生育酚含量(毫克/100克干重) α-tocopherol content (mg/100gDW)	α-生育酚产率(毫克/升) α-tocopherol yield (mg/l)
MS培养基 MS medium	0.324	0.378	0.92	0.119
MC培养基 MC medium	0.323	0.408	0.81	0.105
B_5培养基 B_5 medium	0.284	0.357	0.98	0.111
LS培养基 LS medium	0.325	0.379	0.81	0.105
6,7-V培养基 6,7-Vmedium	0.329	0.385	0.58	0.076
White培养基 White medium	0.117	0.112	No analysis	

表 4 不同有机附加物对红花愈伤组织生长和α-生育酚含量的影响

Table 4 The influence of different organic additives on callus growth and α-tocopherol content of *Carthamus tinctorius*

有机附加物 Additives	收获干重(克/瓶) Harvest DW (g/flask)	生长速率(克干重/升·天) Growth rate (gDW/l·d)	α-生育酚含量(毫克/100克干重) α-tocopherol content (mg/100gDW)	α-生育酚产率(毫克/升) α-tocopherol yield (mg/l)
椰子汁 CM(10%)	0.369	0.449	0.58	0.086
水解乳蛋白 LH(0.1%)	0.258	0.302	0.37	0.038
酪蛋白氨基酸 CA(0.1%)	0.338	0.408	0.81	0.109
对照 1 Control 1	0.251	0.295	0.93	0.093
蛋白胨 Peptone(1 g/l)	0.296	0.340	Trace	--
牛肉浸膏 Beef extract(1 g/l)	0.315	0.366	0.45	0.057
酵母提取液 Yeast extract(1 g/l)	0.290	0.333	0.99	0.115
对照 2 Control 2	0.264	0.297	0.91	0.096

致谢 本所生理室仪器组王华及易永生等协助样品成分分析工作。

参 考 文 献

1 Curtin M E. *Biotechnology* 1983; 1: 649—657
2 日经生物技术，1988年3月28日号：2—3页
3 真野佳博. 植物组织培养 1989; 6(1): 1—9
4 甘烦远，郑光植. 国外医药. 植物药分册 1990; 5(1): 10—14
5 Hildebrand D H, Terao J, Kito M. *J Am Oil Chem Soc* 1984; 61: 552—556
6 Wasserman R H, Taylor A N. *Annual Revium of Biochemistry* 1972; 41: 179—202
7 Furuya T, Yoshikawa T, Kimura T, et al. *Phytochemistry* 1987; 26(10): 2741—2747
8 Bolliger H R, Konig A. Thin-layer chromatography (Stahl E ed) Berlin: Spring-Verlag, 1969: 259—310
9 郑光植，王世林，甘烦远. 生物工程学报 1989; 5(1): 64—69
10 Cheng Kuang-chin, Liang Cheng. Proceedings of symposium on plant tissue culture. Peking: Science Press, 1978: 469—479
11 周平，郑光植. 植物学报 1989; 31(7): 505—511